

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20586

研究課題名(和文) ミュータンスレンサ球菌が引き起こす非アルコール性脂肪肝炎増悪化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of non-alcoholic steatohepatitis aggravation caused by mutans streptococci

研究代表者

仲 周平 (Naka, Shuhei)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：10589774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕原性細菌であるStreptococcus mutansにおいて、菌体表層に分子量約120 kDaのコラーゲン結合タンパク(Cnmタンパク)および分子量約190 kDaのProtein Antigen(PAタンパク)の両方のタンパクを発現する株において生じる非アルコール性脂肪肝炎悪化メカニズムを検討した。その結果、不飽和脂肪酸の1つであるオレイン酸がある程度蓄積された肝臓細胞では、Cnmタンパクを介して肝臓細胞に付着することとPAタンパクを介して脂肪酸と結合することによって、肝臓への菌の付着が有意に増加することで非アルコール性脂肪肝炎を悪化させることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of aggravation of non-alcoholic steatohepatitis caused by Streptococcus mutans, a major pathogen of dental caries, was investigated focusing on the cell surface 120-kDa collagen-binding protein (Cnm protein) and 190-kDa Protein Antigen (PA). In hepatic cells with accumulated oleic acid, a type of unsaturated fatty acids, S. mutans demonstrated an ability to attach the hepatic cells via Cnm protein. In addition, bacterial adhesion to unsaturated fatty acids occurred via PA antigen, causing a prominent increase in bacterial adhesion to hepatic cells, thus leading to aggravation of non-alcoholic steatohepatitis.

研究分野：小児歯科学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 う蝕原性細菌 コラーゲン結合タンパク 肝臓細胞 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

近年、アルコール非摂取者において生じる過剰栄養摂取に起因する肝障害が注目を集めている。これらは、非アルコール性脂肪肝と総称され、肝臓の炎症性変化や線維化の進行した病態は、非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis; NASH) と呼ばれている。歯周病原性細菌と NASH との関連についての研究が、いくつかのグループで行われてきたが、う蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* による病原性を扱った研究は行われてこなかった。

これまでに、我々の研究グループは *S. mutans* のうち一部の菌株が NASH の増悪化に関与している可能性があることを明らかにした。実験には、脂肪肝炎を引き起こすのに通常 48 週間ほど必要な NASH モデルマウスを用いたが、一部の *S. mutans* 菌株を感染させた群では、感染後 8 週程度で有意な体重増加と脂肪蓄積を伴う肝重量増加が認められた。また、病理組織像を検討すると、脂肪蓄積や局所の線維化という NASH 特有の所見を呈した。その後、この一部の菌株の表層には、分子量約 190kDa の Protein antigen (PA タンパク) および分子量約 120kDa のコラーゲン結合タンパク (Cnm タンパク) が共通して発現していることが明らかになった。PA タンパクは、*S. mutans* の菌体における疎水性結合に関連することが知られており、PA タンパクの存在は菌の脂肪酸との結合に関連している可能性があると考えた。また、Cnm タンパクは菌のコラーゲン結合能に関連するため、Cnm タンパクの存在はコラーゲンに富む肝臓組織への付着や細胞への侵入に関与している可能性も考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*S. mutans* の及ぼす NASH の増悪化メカニズムに関して、PA タンパクおよび Cnm タンパクに焦点をあてて、様々な *in vitro* 系の実験および動物モデルを用いて検討し、その詳細を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) マウス NASH モデルにおける検討

C57BL/6J マウス (6 週齢、オス) に 4 週間高脂肪食 (high-fat diet; HFD) を摂取させた後、頸静脈より 1×10^7 CFU の *S. mutans* 菌株を投与する群と非投与の群に分けた。供試菌には *S. mutans* の血液分離株であり Cnm および PA タンパクの両方を発現する TW871 株、TW871 株の Cnm タンパクをコードする遺伝子を不活化することで Cnm タンパクを発現しないようにした TW871CND 株、TW871 株の PA タンパクをコードする遺伝子を不活化することで PA タンパクを発現しないようにした TW871PD 株を用いた。菌投与 12 週後に各群における体重を測定し、屠殺後に摘出した肝臓および内臓脂肪を観察して重量を測定した。また、各群より摘出した肝臓組織切片を作成

し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色および Masson's-trichrome (MT) 染色を行い、マウス肝臓における脂肪の蓄積、炎症性変化および線維化の有無の評価を行った。さらに、抗 IFN- γ 抗体と抗メタロチオネイン抗体を用いた免疫染色を行った。加えて、4 週間 HFD を摂取させたマウスの頸静脈より TW871 株、TW871CND 株、TW871PD 株において Cnm タンパクを発現できるように遺伝子導入した相補株 (TW871CNDcomp 株)、TW871PD 株、TW871PD 株において PA タンパクを発現できるように遺伝子導入した相補株 (TW871PDcomp 株) および TW871 株の Cnm タンパクをコードする遺伝子と PA タンパクをコードする遺伝子の両方を不活化することで Cnm タンパクおよび PA タンパクの両方を発現しないようにした変異株 (TW871CNDPD 株) を投与し、12 週後の体重、肝重量および内臓脂肪重量を測定した。

(2) 脂肪酸に対する *S. mutans* 結合能の検討

従来のヘキサデカンを用いた菌体における疎水性実験の手法をもとに、不飽和脂肪酸 (オレイン酸およびリノール酸) と飽和脂肪酸 (パルミチン酸およびトリパルミチン酸) を使用して、*S. mutans* の発現する PA タンパクの有無による脂肪酸との結合能の違いを評価した。分析には、TW871 株、TW871CND 株および TW871PD 株に加えて、*S. mutans* の標準株である日本人小児口腔由来の MT8148 株 (Cnm 陰性、PA 陽性)、抜歯後菌血症患者からの血液分離株である TW295 株 (Cnm 陽性、PA 陰性) を使用した。

(3) 肝細胞に対する *S. mutans* 付着能の検討

ヒト肝臓癌由来培養細胞である HepG2 細胞に対してオレイン酸を添加することにより脂肪化を生じさせた。この脂肪化した細胞およびオレイン酸を添加せず通常通り培養した細胞を用いて、供試菌の付着能を検討した。検討には、TW871 株、TW871CND 株、TW871PD 株、MT8148 株および TW295 株を使用した。

4. 研究成果

(1) マウス NASH モデルを用いた分析

TW871 株投与群の体重および肝臓重量は、非投与群、TW871CND 群および TW871PD 株投与群と比較して有意に高い値を示した。また、TW871 株投与群より摘出した肝臓組織は、HE 染色において大滴性の脂肪化を認めた。さらに、MT 染色において肝実質および血管周囲に初発線維化像を認めた。一方で、非投与群、TW871CND 株および TW871PD 株投与群より採取した肝臓組織ではこれらの所見は認められなかった。また、免疫染色より TW871 株投与群より摘出した肝臓組織におけるメタロチオネインの発現が他群と比較して多く認められた。IFN- γ の発現は TW871 株投与群より摘出した肝臓組織においてのみ認められた。次に、実験開始 16 週後のマウスより採取した肝臓の重量を測定したところ、TW871comp 株投与群および TW871PDcomp 株投与群の肝重量は、TW871CND 株投与群および TW871PD 株投与

群の肝重量と比較して有意に高い値を示した。TW871CNPD 株投与群の肝重量は欠失株投与群の肝重量と比較して有意に低い値を示した。また、屠殺時のマウスより採取した内臓脂肪重量は、すべての群において有意差を認めなかった。

(2)脂肪酸と供試菌との結合能の分析

PA タンパクを発現している MT8148 株、TW871 株および TW871CND 株は、すべての脂肪酸と高い結合能を示した。一方で、PA タンパクを発現していない TW295 株および TW871PD 株は、ヘキサデカンおよび不飽和脂肪酸に対して低い結合能を示した。

(3)肝臓細胞と供試菌との付着の分析

Cnm タンパクを発現している TW295 株、TW871 株および TW871PD 株は、他の株と比較して有意に高い付着能を示した。一方で、オレイン酸を添加して脂肪化した肝臓細胞には、Cnm および PA タンパクの両方を発現する TW871 株が、他の株と比較して有意に高い付着能を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1. Watanabe I, Kuriyama N, Miyatani F, Nomura R, Naka S, Nakano K, Ihara M, Iwaki K, Matsui D, Ozaki E, Koyama T, Nishigaki M, Yamamoto T, Tamura A, Mizuno T, Akazawa K, Takada A, Takeda A, Yamada K, Nakagawa M, Tanaka T, Kanamura N, Friedland RP, Watanabe Y. Oral Cnm-positive *Streptococcus mutans* expressing collagen binding activity is a risk factor for cerebral microbleeds and cognitive impairment. *Sci Rep* 6,38561,2016.
2. Naka S, Hatakeyama R, Takashima Y, Matsumoto-Nakano M, Nomura R, Nakano K. Contributions of *Streptococcus mutans* Cnm and PA antigens to aggravation of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Sci Rep* 6,36886,2016.
3. Misaki T, Naka S, Hatakeyama R, Fukunaga A, Nomura R, Isozaki T, Nakano K. Presence of *Streptococcus mutans* harboring the *cnm* gene correlates with dental caries status IgA nephropathy conditions. *Sci Rep* 6,36455,2016.
4. 仲 周平 非アルコール性脂肪肝炎悪化に対して口腔細菌の及ぼす影響 小児歯誌 53,365-370,2015.
5. Misaki T, Naka S, Kuroda K, Nomura R, Shiooka T, Naito Y, Suzuki Y, Yasuda H, Isozaki T, Nakano K. Distribution of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins in the oral cavity of IgA nephropathy patients.

Clin Exp Nephrol 19.844-850,2015.

[学会発表](計10件)

1. Misaki T, Naka S, Hatakeyama R, Fukunaga A, Isozaki T, Nakano K. Comparison of urinary protein levels in IgA nephropathy patients with or without *Streptococcus mutans* strains with *cnm* gene encoding collagen-binding protein in the oral cavity ASN Kidney Week, Chicago, USA, 2016.11.15-20.
2. Hatakeyama R, Naka S, Nomura R, Nakano K. Contribution of Cnm and PA of *Streptococcus mutans* to aggravate non-alcoholic steatohepatitis in mice. 63rd Congress of European Organization of Caries Research, Athens, Greek, 2016.7.7-9.
3. Naka S, Misaki T, Takashima Y, Hatakeyama R, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Nakano K. Contribution of Cnm-positive *Streptococcus mutans* strains to IgA nephropathy. 63rd Congress of European Organization of Caries Research, Athens, Greek, 2016.7.7-9.
4. Hatakeyama R, Naka S, Misaki T, Takashima Y, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Nakano K. Cnm-positive *Streptococcus mutans* strains causes IgA nephropathy in rats. 94th Conference of International Association of Dental Research, Seoul, Korea, 2016.6.22-25.
5. 三崎太郎、仲 周平、野村良太、仲野和彦、江間智映実、伊藤誓悟、塩岡天平、鈴木由美子、磯崎泰介 ラットウ蝕モデルにおけるコラーゲン結合蛋白陽性 *Streptococcus mutans* 株による IgA 腎症様病変の誘発 第 59 回日本腎臓学会総会、パシフィコ横浜、2016.6.17-19.
6. Hatakeyama R, Naka S, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Nakano K. Longitudinal investing of non-alcoholic steatohepatitis aggravated by *Streptococcus mutans* infection in mice. The 10th Bennial Conference of Pediatric Dentistry Association of Asia, Tokyo, Japan, 2016.5.26-28.
7. Naka S, Misaki T, Takashima Y, Hatakeyama R, Morita Y, Okawa R, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Nakano K. IgA glomerulonephritis-like finding induced by *Streptococcus*

- mutans* in caries-model rats, The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Fukuoka, Japan, 2015.10.30-31.
8. Naka S. Contribution of oral bacteria to aggravation of non-alcoholic steatohepatitis. 4th Asia Pacific Congress & Expo on Dental and Oral Health. Brisbane, Australia, 2015.7.27-29.
 9. 黒田景子, 仲 周平, 野村良太, 仲野和彦. IgA 腎症患者の口腔に存在する Cnm 陽性 *Streptococcus mutans* 株の検討 .第 53 回日本小児歯科学会大会, 広島, 2015.5.21-22 .
 10. 梶原理那, 仲 周平, 野村良太, 仲野和彦. 各種脂肪酸に対する *Streptococcus mutans* 株の結合能に関する検討 .第 53 回日本小児歯科学会大会, 広島, 2015.5.21-22 .

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~pedo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

仲 周平 (NAKA, Shuhei)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：1 0 5 8 9 7 7 4

(4)研究協力者

仲野 和彦 (NAKANO, Kazuhiko)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：0 0 3 7 9 0 8 3

野村 良太 (NOMURA, Ryota)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：9 0 4 3 7 3 8 5